Aus der Medizinischen Klinik der Universität Marburg
(Direktor: Prof. Dr. med. G. A. Martini)

UNTERSUCHUNGEN OBER DIE BEDEUTUNG DER XANTHINOXYDASE FOR DEN EISENSTOFFWECHSEL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Orapan Chearanai
aus Bangkok/Thailand

Marburg 1969

Druck von E. Mauersberger in Marburg

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Marburg
(Direktor: Prof. Dr. med. G. A. Martini)

UNTERSUCHUNGEN OBER DIE BEDEUTUNG DER XANTHINOXYDASE FOR DEN EISENSTOFFWECHSEL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Orapan Chearanai
aus Bangkok/Thailand

Marburg 1969

Druck von E. Mauersberger in Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 27. Februar 1969
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. W. Straub
Referent: Priv. Doz. Dr. med. G. Strohmeyer
Correferent: Prof. Dr. med. G.A. Martini

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
Einleitung	1
Versuchsanordnung und Methoden	3
Ergebnisse	7
Diskussion	11
Zusammenfassung	20
Literatur	-

E I N L E I T U N G

Der Mechanismus der Eisenspeicherung und Freisetzung von Eisen aus den Körperdepots ist noch weitgehend unbekannt. Auf Grund tierexperimenteller Untersuchungen stellten GREEN und MAZUR (24) die Hypothese auf, daß die Mobilisierung des Eisens aus Leberferritin und die Abgabe ins Plasma durch das Enzym Xanthinoxydase gesteuert würde. Diese Auffassung gründete sich auf Versuche, die zeigten, daß nach schweren Traumen und im Blutungsschock bei Tieren eine Erhöhung des Serum-Eisens von einem Anstieg der Harnsäure im Serum begleitet war. Die bei einem Kreislaufschock einsetzende Gewebshypoxie, besonders in der Leber, führt offenbar u. a. zu einer Anhäufung von Endprodukten des Purinstoffwechsels, insbesondere von Xanthin und Hypoxanthin. Diese sind Substrate des Enzyms Xanthinoxydase, die sie zu Harnsäure oxydiert. MAZUR u. Mitarb. (22) verknüpften den durch Schock ausgelösten Serumeisen- und Harnsäureanstieg miteinander und stellten die Hypothese auf, daß bei der Harnsäurebildung aus Xanthin und Hypoxanthin in der Leber die reduzierte Xanthinoxydase mit dem Ferritin reagiert. Dabei wird das dreiwertige Eisen des Ferritins durch Elektronenaufnahme zum Ferro-II-Eisen reduziert (s. Abb. 1), so daß es aus der Ferritinbindung austreten und durch das Transferrin des Plasmas gebunden werden kann. Dieser Mechanismus könnte also den Serumeisenspiegel und die Eisendepots durch die Aktivität der Xanthinoxydase und durch die Konzentration ihrer Substrate regulieren. (Abb. 3).

Die Xanthinoxydase (XOD) findet sich beim Menschen in der Leber, Darmmucosa und im Knochenmark. Die höchste Enzymkonzentration wurde in der Darmmucosa (31) nachgewiesen. Xanthinoxydase ist ein Flavoprotein mit einem Molekulargewicht von 32o ooo. Die aktiven Bindungsstellen enthalten Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), ein Atom Molybdän und 8 Atome Eisen (31).

Auf Grund der Befunde von MAZUR und GREEN (16, 17, 22) über die Funktion der Xanthinoxydase bei der Eisenfreisetzung aus den Depots schien es möglich, daß diesem Enzym im Eisenstoffwechsel eine große

Bedeutung zukommt. Da die enzymatische Umwandlung von Ferri-Ferritin in Ferro-Ferritin durch die Xanthinoxydase der Eisenmobilisation vorausgehen muß, könnte theoretisch eine hereditäre oder erworbene Verminderung oder ein Fehlen der XOD zu einer nicht mehr reversiblen Eisenspeicherung in der Leber führen. Dadurch würden sich für die Pathogenese der Eisenspeicherkrankheiten neue Gesichtspunkte ergeben, die auch für die Klinik und Therapie dieser Erkrankungen von großer Bedeutung sein könnten.

Um einen Einblick in die Beziehungen zwischen Eisen- und Purinstoffwechsel und der Bedeutung der Xanthinoxydase zu bekommen, wurden tierexperimentelle Untersuchungen an Ratten durchgeführt. Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Der Einfluß einer eisenfreien Ernährung auf den Eisenstoffwechsel und die Eisendepots, sowie die Enzymaktivität der XOD.
2. Die Veränderungen des Eisenstoffwechsels nach einer einmaligen Gabe einer relativ großen Eisenmenge und mehrwöchiger eisenfreier Ernährung.
3. Der Einfluß einer Hemmung der XOD durch den spezifischen Inhibitor Allopurinol (4-Hydroxypyrazolo 3-4-d-Pyrimidin) auf den Eisenstoffwechsel und die Eisendepots in Leber und Darm.

Die experimentelle Bearbeitung dieser Fragen und die Diskussion der dabei gewonnenen Befunde sind Inhalt dieser Arbeit.

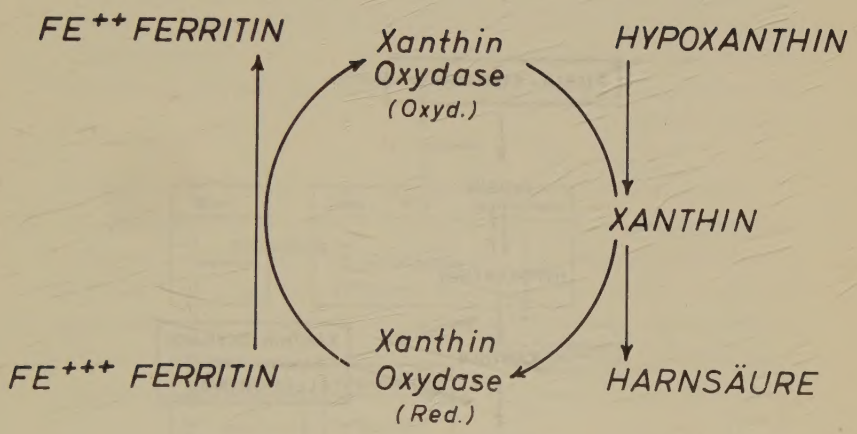

Abb. 1 Schematische Darstellung der Fermentwirkung der Xanthinoxydase bei der Oxydation von Hypoxanthin und Xanthin und der Reduktion von Ferri-Ferritin zu Ferro-Ferritin.

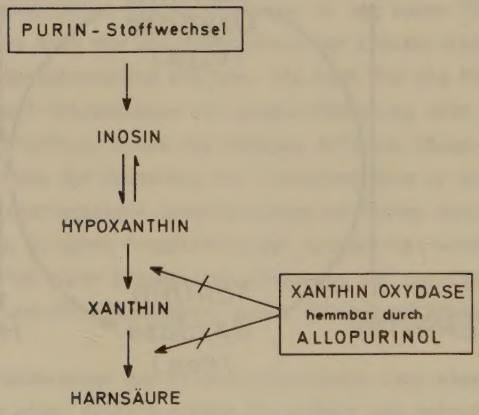

Abb. 2 Schema der Harnsäurebildung und ihre Hemmung durch Allopurinol

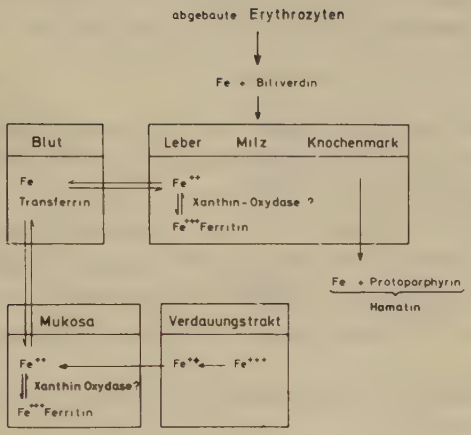

Abb. 3 Stoffwechselschema des Eisens. Vermuteter Wirkungsmechanismus der Xanthinoxydase.

Versuchsanordnung und Methoden

I Tierexperimentelle Untersuchungen: 8 männliche, 2 Wochen alte Wistar-Ratten (Gewicht 9o-1oo g) wurden 6 Wochen eisenfrei ernährt. Sie erhielten während dieser Zeit die von der Fa. Altromin hergestellte eisenarme Diät (C 176o). 1o Ratten des gleichen Wurfes dienten als Kontrollen.

II 1o männliche, wachsende Ratten (9o-1oo g) wurden unter gleichen Bedingungen wie im Versuch I eisenfrei ernährt. 6 Wochen später erhielten sie 85o µg $^{59}Fe^{++}$ als Ferrochlorid + 4o mg Ascorbinsäure oral durch eine Schlundsonde. Bei diesen Tieren wurde auch die Eisenresorption des oral gegebenen Eisens durch Messung der Gesamtkörperradioaktivität bestimmt. 1o Ratten des gleichen Wurfes dienten als Kontrollen. Die Tiere wurden 1o Tage nach der einmaligen Eisengabe getötet.

III 2o männliche Ratten (Gewicht 25o-3oo g) wurden in 4 Gruppen zu je 5 Tieren eingeteilt:

A	5 Tiere	Kontrollen:	Normalfutter
D	5 Tiere	Kontrollen:	Normalfutter + o,8% Eisenchlorid im Trinkwasser
B	5 Tiere		2o mg Allopurinol/kg Körpergewicht dem Futter zugemischt
C	5 Tiere		2o mg Allopurinol/kg Körpergewicht + o,8% Fe Cl_3 (Ceferro) im Trinkwasser

---

A	5 Tiere	Kontrollen:	Normalfutter
D	5 Tiere	Kontrollen:	Normalfutter + o,8 % Fe-Chlorid im Trinkwasser
B	5 Tiere		1o mg Allopurinol/kg Körpergewicht intraperitoneal
C	5 Tiere		1o mg Allopurinol/kg Körpergewicht intraperitoneal + o,8 % Eisenchlorid im Trinkwasser

IV Die tierexperimentellen Untersuchungen der Gruppe III wurden mit höheren Dosen von Allopurinol wiederholt:

A	6 Tiere	Kontrollen:	Normalfutter
D	6 Tiere	Kontrollen:	o,8% Eisenchlorid im Trinkwasser
B_1	6 Tiere		normales Futter + 45 mg Allopurinol/kg Körpergewicht/die durch Schlundsonde, 21 Tage lang
B_2	6 Tiere		normales Futter + 25 mg Allopurinol/kg Körpergewicht/die intraperitoneal, 21 Tage lang
C_1	6 Tiere		45 mg Allopurinol/kg Körpergewicht durch Schlundsonde über 21 Tage + o,8% Eisenchlorid im Trinkwasser
C_2	6 Tiere		25 mg Allopurinol/kg Körpergewicht intraperitoneal, 21 Tage lang + o,8% Eisenchlorid im Trinkwasser

Die Allopurinollösungen wurden mit Natriumhydroxyd (NaOH) in Lösung gebracht. Der End-pH-Wert betrug 1o,5.

Biochemische Untersuchungen: Zur Durchführung von biochemischen und histochemischen Untersuchungen wurden die Ratten durch Entbluten getötet. Unter Äthernarkose wurde die Aorta punktiert und das Blut mit silikonisierten Spritzen entnommen. Gleichzeitig wurde die Leber und der gesamte Dünndarm entnommen, in eisgekühlter Ringerlösung suspendiert und einige Minuten bis zur Homogenisierung in Eis aufbewahrt. Die Darmmukosa wurde nach Umstülpung des Dünndarms durch Abschaben mit einem Objektträger gewonnen.

Im Blut wurde folgende Bestimmung durchgeführt:

a) Hämoglobin nach der Cyanhämiglobinmethode

b) Serumeisen nach RAMSAY (29, 3o)

c) Harnsäure nach der Uricase-Methode (Biochemica Boehringer & Söhne GmbH., Mannheim)

in Leber und Dünndarmmukosa:

d) Xanthinoxydase

e) Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (nur im Experiment IV)

f) Nicht-Hämineisen nach der Methode von WEINFELD (37)

Bestimmung der Xanthinoxydaseaktivität (19, 26, 36): Frische Leber oder Darm (Mukosa) wurde mit o,25 M Saccharose im Potter-ELVEHJEM-Glashomogenisator homogenisiert (2 g Lebergewebe auf 2o ml Saccharose (o,25 M, pH 7,2) und 1,5gDarmmukosa auf 2o ml Saccharoselösung). Das Homogenat wurde bei 25 oooxg 45 Minuten lang im Kalten zentrifugiert, der Oberstand abpipettiert und über Nacht bei -20^{o} aufbewahrt. 1 ml davon wurde mit 9 ml einer o,1 M Pyrophosphatlösung (pH 8,3) verdünnt und bei 37^{o} 1 Stunde lang inkubiert. 2,5 ml des verdünnten Oberstandes wurden zum Enzymtest eingesetzt. Der Start der Reaktion erfolgte mit 15 µl einer $3x1o^{-4}$ M Natriumxanthinlösung (End-konzentration $6x1o^{-5}$ M). Die Extinktionsmessungen erfolgten in einer Quarzküvette bei 295 nm mit einem Zeiss-Spektrophotometer 1o Minuten lang (19, 26). Die Xanthinoxydaseaktivität wurde in Δ e/Gramm Protein pro Minute ausgedrückt. Der Proteingehalt wurde nach der BIURET-Methode bestimmt.

Die Abb. 4 zeigt, daß eine lineare Beziehung zwischen dem Extinktionskoeffizienten und steigenden Mengen von Überstand (steigende Xanthinoxydase) besteht.

Bestimmung des gesamten Nicht-Hämineisens im Gewebe nach WEINFELD (37): Diese Bestimmung basiert auf der Extraktion des Nicht-Hämineisens aus dem Gewebe mit Salzsäure.

Ausführung:

Alle Geräte müssen sorgfältig mit HCl gewaschen und mit Aqua bidest nachgespült werden.

5oo-1ooo mg Leber werden mit Aqua bidest im Glashomogenisator (1oo mg Leber/1 ml Aqua bidest) bis zu einer höchst feinen Suspension homogenisiert. Das Homogenat wird in ein graduiertes Röhrchen überführt. 4 ml davon werden zur Säurehydrolyse genommen. Danach

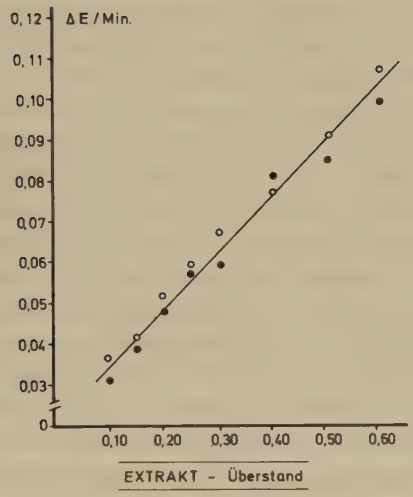

Abb. 4 Bestimmung der Aktivität der Xanthinoxydase im optischen Test. Beziehung zwischen der Extinktion und der Menge des eingesetzten Überstandes in ml.

werden 2 ml einer 8,5 n HCl zu-pipettiert. Die Hydrolyse erfolgt 6o Minuten lang bei 9o°. Nach dem Abkühlen läßt man langsam 4 ml 2o%ige TCA (Trichloressigsäure) zulaufen, um den Rest des Proteins zu fällen. Danach läßt man die Probe 2o Minuten stehen, und zentrifugiert dann 1o Minuten lang bei 3 ooo U/Minute. Danach erfolgt die Filtration des klaren gelben Oberstandes durch ein mit Salzsäure gewaschenes Filter in einen Erlenmeyerkolben. Genauso wird mit dem Präzipitat verfahren, nachdem es zweimal mit 1 ml einer Mischung aus gleichen Teilen 4,25 n HCl und 2o%iger Trichloressigsäure gewaschen und zentrifugiert worden ist. Dem Filtrat werden 8 ml einer 1 m Natriumzitratlösung zugesetzt und filtriert. Danach wird das Ganze mit 1 ml 1o n Ammoniak wiederholt. Das Filtrat wird mit Aqua bidest auf 25 ml aufgefüllt. Von dieser Lösung werden zweimal je 5 ml abpipettiert, mit o,1 ml 2%igem Hydrochinon versetzt und o,1 ml 1%iges o-Phenanthrolin-Hydrochloridlösung einer Probe zugesetzt. Zur anderen Probe, der Kontrolle, werden o,1 ml Aqua bidest zu-pipettiert. 16 Stunden nach der o-Phenanthrolin-Zugabe wird in beiden Proben die Extinktion gemessen. Zur Korrektur der gelben Farbe und der leichten Trübung bei fettigen Proben wird die Kontrolle von der ersten Probe abgezogen. Die Extinktionsmessungen werden mit dem Zeiss-Photometer bei einer Wellenlänge von 5o5 nm und in Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 1o ml vorgenommen. Der Farbkomplex bleibt ungefähr 5o Stunden stabil. Zur Berechnung der Eisenkonzentration wird eine Standardlösung aus Mohr'schem Salz herangezogen. Die Fehlerbreite der Messung der Standardlösung beträgt 2%.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach Mittelwert und Standardabweichung. Die Signifikanz von Differenzen wurde nach dem t-Test von STUDENT berechnet.

E R G E B N I S S E

Experiment I

Die 8 über 6 Wochen eisenfrei ernährten Tiere hatten im Mittel das gleiche Körpergewicht wie die Kontrolltiere. Der Gesamtproteingehalt von Leber und Darm änderte sich durch die eisenfreie Spezialdiät nicht (s. Abb. 5). Dagegen war das Hämoglobin der Eisenmangeltiere gegenüber den Kontrollen signifikant erniedrigt ($p < 0{,}001$), während das Serumeisen nur geringfügige, nicht signifikante Differenzen ($p > 0{,}30$) in beiden Gruppen aufwies (s. Abb. 6). Der NIcht-Hämingehalt der Leber (s. Abb. 6), also das Depoteisen, war bei den eisenfrei ernährten Tieren gegenüber den Kontrollen stark abgefallen ($p < 0{,}001$). Auch die Aktivität der Xanthinoxydase (Δ E/Min./g Protein im Oberstand) in der Leber und Dünndarmmukosa war im Vergleich zu den Kontrollen signifikant ($p < 0.01$ bzw. $p < 0.001$) vermindert (s. Abb. 7).

Experiment II

Bei diesem Versuch erhielten 10 Ratten nach 6-wöchiger eisenfreier Ernährung einmalig 850 µg ^{59}Fe als Eisenchlorid + 40 mg Ascorbinsäure durch eine Schlundsonde. Es wurde bei diesen Untersuchungen radioaktives Eisen gegeben, weil bei den Tieren gleichzeitig die Eisenresorption gemessen werden sollte. Der Ascorbinsäurezusatz diente der Stabilisierung des zweiwertigen Eisens. Ein Teil der Tiere erhielt außerdem Pankreatin mit der Schlundsonde, weil der Einfluß von Pankreatin auf die Eisenresorption studiert wurde. Das ERgebnis dieser gesonderten Untersuchungen wird hier nicht dargestellt.

Wie die Abb. 8 und 9 zeigen, ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht, Hämoglobin, Serumeisen und Xanthinoxydaseaktivität von Leber und Darm bei Vergleich von Kontrollen und behandelten Tieren feststellen.

Experiment III

Für diese Untersuchungen wurden 20 Ratten in 4 Gruppen zu je 5 Tieren eingeteilt. Von den beiden Kontrollgruppen (A und D) erhielt Gruppe A normales Futter (Altromin), während die Gruppe D Normalfutter und

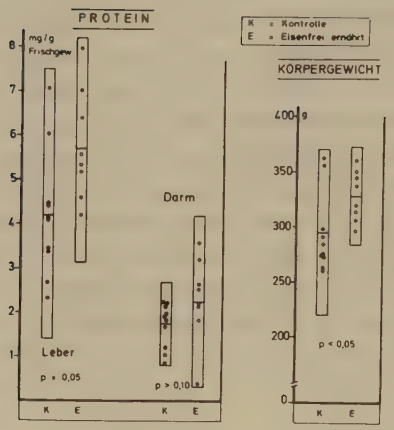

Abb. 5 Proteingehalt in Leber und Darmmukosa, sowie Körpergewicht von Ratten nach sechswöchiger eisenfreier Ernährung. (Exp. I)

K = Kontrolle
E = eisenfreie Ernährung für 6 Wochen

Statistik

a) Protein: Leber
K:E = $p = 0.05$
Darm
K:E = $p > 0.10$

b) Körpergewicht:
K:E = $p > 0.05$

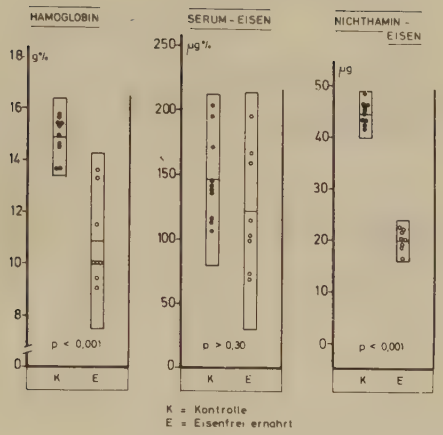

Abb. 6 Hämoglobin, Serumeisen und Nicht-Hämineisen in der Leber bei Ratten nach sechswöchiger eisenfreier Ernährung (Exp. I)

K = Kontrolle
E = eisenfreie Ernährung für 6 Wochen

Statistik

a) Hämoglobin: K:E = $p < 0.001$
b) Serumeisen: K:E = $p > 0.30$
c) Nicht-Hämineisen K:E = $p < 0.001$

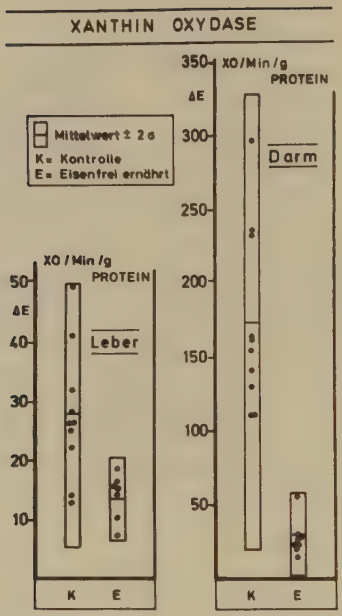

Abb. 7 Xanthinoxydase Aktivität in der Leber und Darmmukosa von Ratten nach sechswöchiger eisenfreier Ernährung (Exp. I)

K = Kontrolle
E = eisenfreie Ernährung für 6 Wochen

Statistik

a) XOD-Aktivität in Leber:
K:E = $p < 0.01$

b) XOD-Aktivität in Darm:
K:E = $p < 0.001$

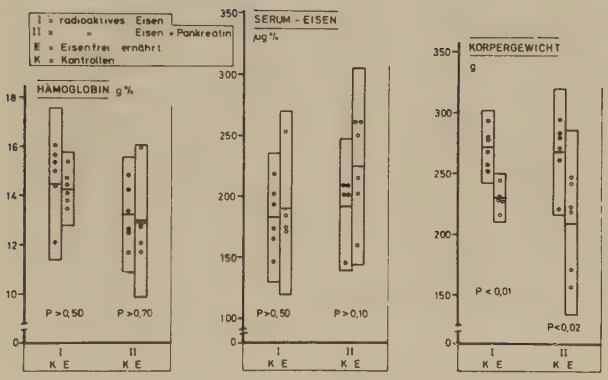

Abb. 8 Hämoglobin, Serumeisen und Körpergewicht von eisenfrei-ernährten Ratten nach einer einmaligen Dosis von radioaktivem Eisen (Exp. II), nach 1 Woche.

K_I = Kontrolle, Normalfutter für 6 Wochen + einmalig 850 µg ^{59}Fe (Ferrochlorid)

E_I = eisenfreie Ernährung für 6 Wochen + einmalig 850 µg ^{59}Fe (Ferrochlorid)

$K_{II} = K_I$ + Pankreatin

$E_{II} = E_I$ + Pankreatin

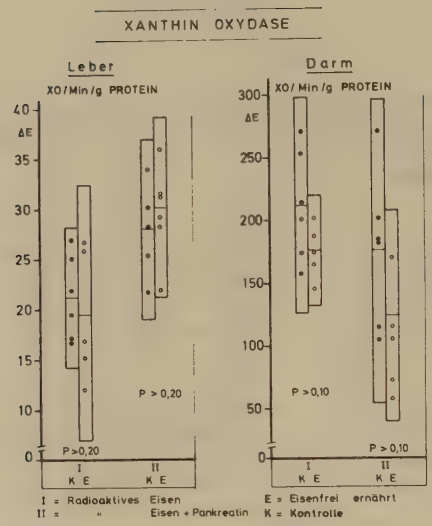

Abb. 9 Xanthinoxydase Aktivität in der Leber und Darmmukosa von eisenfrei-ernährten Ratten nach einer einmaligen Dosis von radioaktivem Eisen (Exp. II), nach 1 Woche.

K_I = Kontrolle, Normalfutter für 6 Wochen + einmalig 850 /ug ^{59}Fe (Ferrochlorid)

E_I = eisenfreie Ernährung für 6 Wochen + einmalig 850 /ug ^{59}Fe (Ferrochlorid)

$K_{II} = K_I$ + Pankreatin

$E_{II} = E_I$ + Pankreatin

o,8% Eisen als Eisenchlorid, (C-Ferro) im Trinkwasser bekam. Die 1o Tiere der Gruppe B und C erhielten 14 Tage lang 2o mg Allopurinol/kg Körpergewicht in das Futter gemischt. Die Gruppe C erhielt außer Allopurinol o,8% Eisen im Trinkwasser.

Allopurinolbehandelte Tiere und Kontrollratten entwickelten sich normal und hatten im Durchschnitt ein gleiches Körpergewicht von ungefähr 25o-3oo g. Der Gesamtproteingehalt von Leber und Darm war bei Kontrollen und behandelten Tieren in allen Gruppen nicht signifikant verschieden (s. Abb. 1o). Auch das Hämoglobin, Serumeisen, Nicht-Hämineisen (s. Abb. 11), sowie die Aktivität der Xanthinoxydase in Leber und Darm änderten sich nicht signifikant. Auch nach 14-tägiger täglicher intraperitonealer Gabe von 1o mg Allopurinol/kg Körpergewicht ließ sich kein Unterschied in der XOD-Aktivität zwischen Kontrolltieren (Gruppe A und D) und allopurinolbehandelten Tieren (Gruppe C) feststellen (s. Abb. 12).

Experiment IV

Da ausgeschlossen werden mußte, daß das negative Ergebnis der Untersuchungen des Experimentes III auf eine zu niedrige Allopurinoldosis beruhte, wurden diese Untersuchungen mit einer höheren Dosierung wiederholt. Es wurde sonst die gleiche Versuchsanordnung eingehalten wie im Experiment III:

Gruppe A und D waren Kontrollen (Gruppe D erhielt Normalfutter + o,8% Eisenchlorid). Für die Gruppen B_1 und C_1 wurde die tägliche Allopurinoldosis auf 45 mg/kg Körpergewicht erhöht. Das Allopurinol wurde 21 Tage lang täglich mit Schlundsonde verabreicht, um eine sichere Aufnahme zu gewährleisten. Die Tiere der Gruppen B_2 und C_2 erhielten 21 Tage lang täglich 25 mg Allopurinol/kg Körpergewicht intraperitoneal.

Bei diesem Experiment wurde außer der Xanthinoxydase (XOD noch ein weiteres Enzym, die Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Dadurch sollte festgestellt werden, ob der evtl. eintretende Effekt von Allopurinol spezifisch die XOD betrifft oder auch die Aktivität anderer Enzyme beeinflußt.

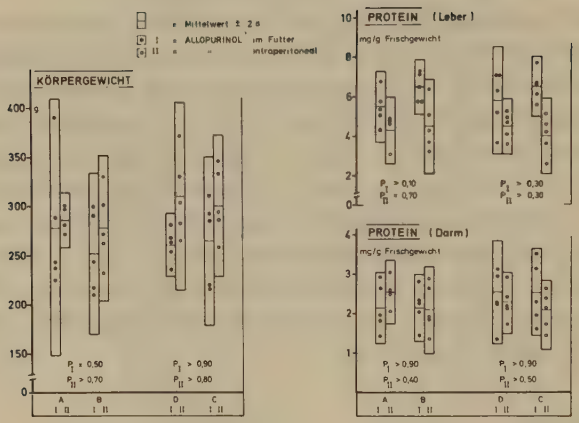

Abb. 10 Der Einfluß von Allopurinol (Dosis: 20 mg oral, 10 mg intraperitoneal) auf Körpergewicht und Proteingehalt der Leber und Darmmukosa von Ratten (Exp. III)

A_I, A_{II} = Kontrolle, Normalfutter
B_I = Allopurinol, 20 mg/kg oral, 14 Tage
C_I = B_I + 0,8% Fe im Trinkwasser
B_{II} = Allopurinol, 10 mg/kg intraperitoneal, 14 Tage
C_{II} = B_{II} + 0,8% Fe im Trinkwasser
D_I, D_{II} = A + 0,8% Fe im Trinkwasser

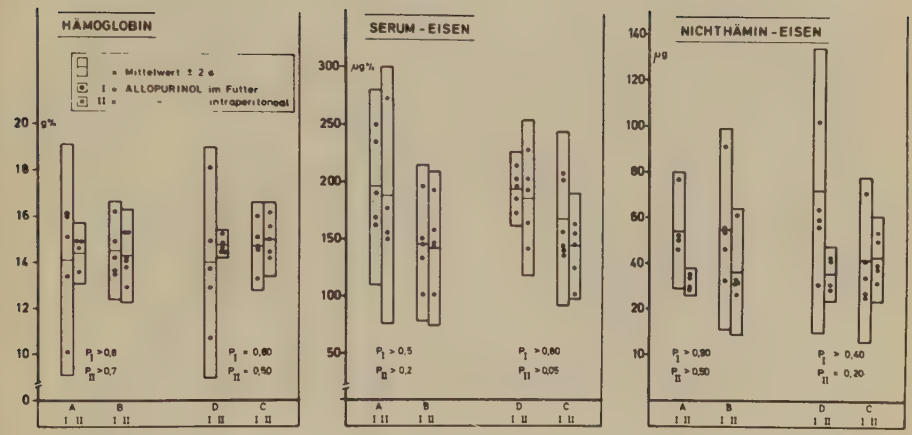

Abb. 11 Der Einfluß von Allopurinol (Dosis: 20 mg oral, 10 mg intraperitoneal) auf Hämoglobin, Serumeisen und Nicht-Hämineisen (Leber) von Ratten (Exp. III)

A_I, A_{II} = Kontrolle, Normalfutter
B_I = Allopurinol, 20 mg/kg oral, 14 Tage
C_I = B_I + 0,8% Fe im Trinkwasser
B_{II} = Allopurinol, 10 mg/kg intraperitoneal, 14 Tage
C_{II} = B_{II} + 0,8% Fe im Trinkwasser
D_I, D_{II} = A + 0,84 Fe im Trinkwasser

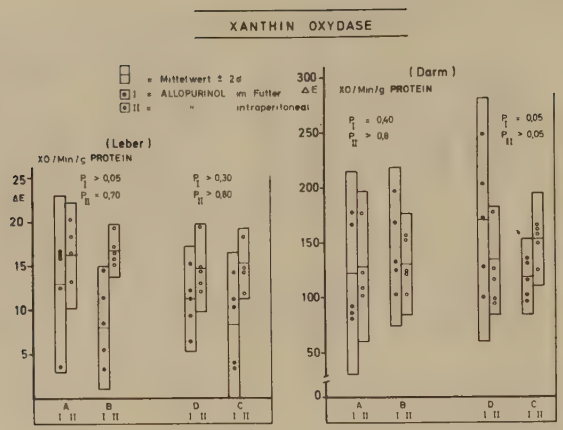

Abb. 12 Der Einfluß von Allopurinol (Dosis: 20 mg oral, 10 mg intraperitoneal) auf die Aktivität der Xanthinoxydase in der Leber und Darmmukosa von Ratten (Exp. III)

A_I, A_{II} = Kontrolle, Normalfutter
B_I = Allopurinol, 20 mg/kg oral, 14 Tage
C_I = B_I + 0,8% Fe im Trinkwasser
B_{II} = Allopurinol, 10 mg/kg intraperitoneal, 14 Tage
C_{II} = B_{II} + 0,8% Fe im Trinkwasser
D_I, D_{II} = A + 0,8% Fe im Trinkwasser

Die Ergebnisse des Experimentes IV sind in den Abb. 13, 14, 15 und 16 dargestellt. Durch die orale oder parenterale Verabreichung von Allopurinol wird die Nahrungsaufnahme, das Wachstum und das Körpergewicht der Tiere nicht beeinträchtigt, wie sich aus dem Vergleich mit den Kontrolltieren ersehen läßt (Abb. 13 und 14). Auch das Gesamtprotein in Leber und Darm, Hämoglobin im Blut, Harnsäure im Blut und Serumeisen verändern sich nicht signifikant bei Kontrolltieren und allopurinolbehandelten Tieren (Abb. 13 und 14). Dagegen kommt es jedoch bei den allopurinolbehandelten Tieren nach oraler Gabe zu einem signifikanten Anstieg des Nicht-Hämineisens in der Leber (Abb. 14). Nach intraperitonealer Verabreichung trat die Zunahme des Nicht-Hämineisens nicht ein (Abb. 14). Besonders stark war die Vermehrung des Nicht -Hämineisens in der Leber bei den Tieren, die zusätzlich noch Eisen mit dem Trinkwasser aufnahmen (Abb. 14).

Die Aktivität der Xanthinoxydase in der Leber (Abb. 15) nahm bei den allopurinolbehandelten Ratten signifikant ab ($p < 0.01$). Dagegen blieb die Enzymaktivität der XOD im Darm normal (Abb. 15). Die gleichzeitige orale Gabe von Allopurinol und von Eisen im Trinkwasser führte zu einer besonders starken Abnahme der Aktivität der XOD ($p < 0.001$), bei gleichzeitigem Anstieg der Eisendepots in der Leber (Nicht-Hämineisen). Bei parenteraler Gabe von Allopurinol und zusätzlicher oraler Eisengabe blieb die XOD in der Leber normal (Abb. 15).

Die Bestimmung der GAPDH in der Leber und Darmmukosa ergab (Abb. 16), daß die Veränderungen der Enzymaktivitäten etwa denen der XOD parallel liefen: nach oraler Allopurinolgabe nimmt die Aktivität der GAPDH in der Leber signifikant ab ($p < 0.05$), nach parenteraler Verabreichung ändert sie sich nicht. Bei gleichzeitiger zusätzlicher oraler Eisenaufnahme mit dem Trinkwasser (Gruppe C) fällt die Enzymaktivität weiter ab ($p < 0.01$). Dagegen lassen sich bei allen Gruppen keine Veränderungen der Enzymaktivität der GAPDH im Darm nachweisen.

Wie oben im einzelnen ausgeführt wurde, kam es unter bestimmten experimentellen Bedingungen (eisenfreie Ernährung, Behandlung mit Allopurinol) zu deutlichen quantitativen Veränderungen des Nicht-Hämin-

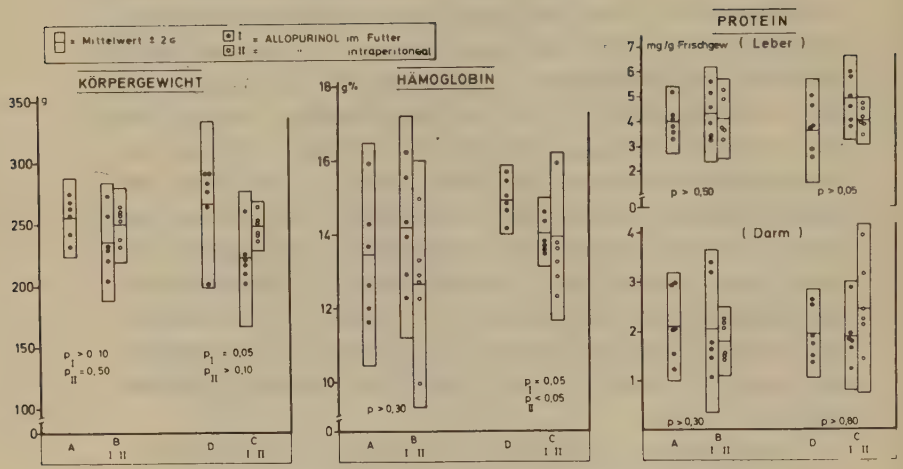

Abb. 13 Der Einfluß von Allopurinol (Dosis: 45 mg oral, 25 mg intraperitoneal) auf Köpergewicht, Hämoglobin und Proteingehalt der Leber und Darmmukosa von Ratten (Exp. IV)

A = Kontrolle, Normalfutter
B_I = Allopurinol, 45 mg/kg oral, 21 Tage
C_I = B_I + 0,8% Fe im Trinkwasser
B_{II} = Allopurinol, 25 mg/kg intraperitoneal, 21 Tage
C_{II} = B_{II} + 0,8% Fe im Trinkwasser
D = A + 0,8% Fe im Trinkwasser

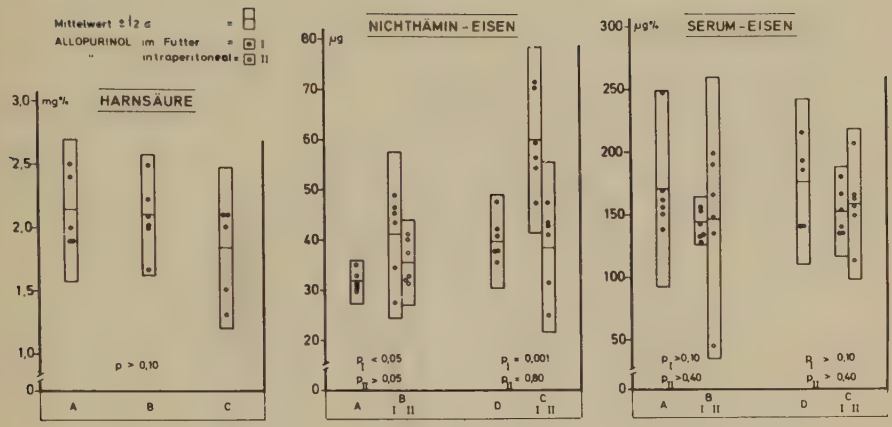

Abb. 14 Der Einfluß von Allopurinol (Dosis: 45 mg oral, 25 mg intraperitoneal) auf Harnsäure, Nicht-Hämineisen (Leber) und Serumeisen von Ratten (Exp. IV)

A = Kontrolle, Normalfutter
B_I = Allopurinol, 45 mg/kg oral, 21 Tage
C_I = B_I + 0,8% Fe im Trinkwasser
B_{II} = Allopurinol, 25 mg/kg intraperitoneal, 21 Tage
C_{II} = B_{II} + 0,8% Fe im Trinkwasser
D = A + 0,8% Fe im Trinkwasser

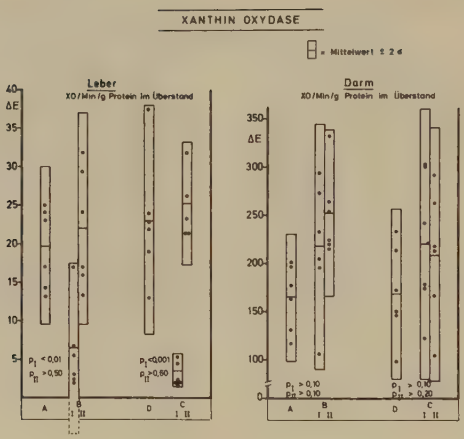

Abb. 15 Der Einfluß von Allopurinol (Dosis: 45 mg oral, 25 mg intraperitoneal) auf die Aktivität der Xanthinoxydase in Leber und Darmmukosa von Ratten (Exp. IV)

A = Kontrolle, Normalfutter
B_I = Allopurinol, 45 mg/kg oral, 21 Tage
C_I = B_I + 0,8% Fe im Trinkwasser
B_{II} = Allopurinol, 25 mg/kg intraperitoneal, 21 Tage
C_{II} = B_{II} + 0,8% Fe im Trinkwasser
D = A + 0,8% Fe im Trinkwasser

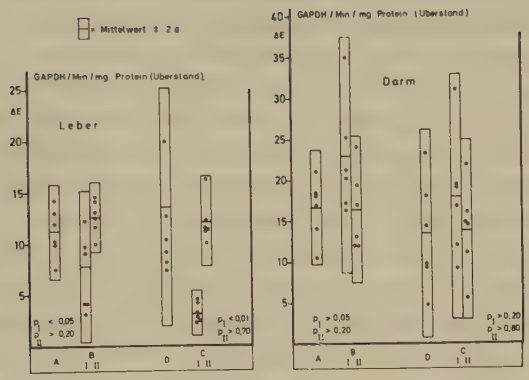

Abb. 16 Der Einfluß von Allopurinol (Dosis: 45 mg oral, 25 mg intraperitoneal) auf die GAPDH Aktivität in Leber und Darmmukosa von Ratten (Exp. IV)

A = Kontrolle, Normalfutter
B_I = Allopurinol, 45 mg/kg oral, 21 Tage
C_I = B_I + 0,8% Fe im Trinkwasser
B_{II} = Allopurinol, 25 mg/kg intraperitoneal, 21 Tage
C_{II} = B_{II} + 0,8% Fe im Trinkwasser
D = A + 0,8% Fe im Trinkwasser

eisengehaltes in der Leber und Darmmukosa (Abb. 6 und 14). Diese eindeutigen, mit der chemischen Eisenbestimmungsmethode in den Geweben gewonnenen Befunde, ließen sich nur bei einem Teil der allopurinolbehandelten Tiere auch histochemisch nachweisen. Nur bei 4 von 12 Tieren ließen sichim Leberparenchym Eisengranula histochemisch darstellen.

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Korb, Komm. Direktor des Pathologischen Institutes der Universität Marburg für diese Untersuchungen danken.

D I S K U S S I O N

Das Enzym Xanthinoxydase (Synonyma: Xanthopterin-Oxydase, SCHARDINGER-Enzym) ist ein Flavoprotein mit einem Molekulargewicht von 32o ooo (7, 31, 38). Es kommt in verschiedenen Körpergeweben, insbesondere in der Leber, Darmmukosa und Knochenmark vor. Seine bekannteste Wirkung hat die Xanthinoxydase (XOD) im Purinstoffwechsel, wo es die Oxydation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure unter O_2-Verbrauch katalysiert. Von SCHARDINGER wurde 19o2 beschrieben, daß mit frischer Milch, die besonders reich ist an XOD, unter Zusatz von Aldehyden Methylenblau entfärbt wird. Diese Reaktion hat in der Lebensmittelchemie heute noch Bedeutung. Einige Jahre später gelang es, die Identität des SCHARDINGER-Enzyms und der XOD zu beweisen. XOD wird immer noch vorzugsweise aus Milch gewonnen. Die Aktivität der XOD wird spektrophotometrisch durch Messung der zeitlichen Zunahme von entstehender Harnsäure bestimmt (19, 36):

$$\text{Hypoxanthin} + 2H_2O + CO_2 \xrightarrow{XOD} \text{ergibt Harnsäure} + 2H_2O_2$$

Die Substratspezifität des Enzyms ist sehr gering. Außer Xanthin und Hypoxanthin werden viele Purine und Aldehyde oxydiert.

Die XOD enthält zwei aktive Bindungsstellen, die aus Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) bestehen, von denen nur eine von Sauerstoff, Farbstoffen (z.B. Methylenblau) Chinonen und Cytochromen oxydiert werden kann. Die aktiven Bindungsstellen enthalten außerdem noch ein Atom Molybdän und 8 Atome Eisen (Fe:FAD:Mo = 8:2:1) (7, 31). Diese Metalle an den aktiven Stellen sind durch verschiedene Bindungen an eine Sulfhydrylgruppe und jeweils an die Flavine gebunden. Nach den Vorstellungen von FRIDOVICH und HANDLER (12) soll die eine FAD-Gruppe bei Oxydationsreaktionen Elektronen von Purinsubstraten aufnehmen und dann über die Metall-(Ferri)-Merkapto-Gruppen an die zweite FAD-Gruppe weitergeben, die als Elektronenakzeptor wirkt. Durch Quecksilber und Cyanid wird die XOD irreversibel inaktiviert. Dabei reagiert das Cyanid wahrscheinlich mit dem Metall des Enzyms. Das Enzym wird durch Pteroylglutaminsäure (Xanthopterin) und 2-Amino-4-Hydroxy-6-Formylpteridin (o,o2 /ug/ml) vollständig gehemmt. Eine kompetitive Hemmung der

XOD bewirken 6-Chloropurin, 6-Merkaptopurin und 4-Hydroxy-pyrazolo-(3, 4-d)-Pyrimidin (Allopurinol). Die zuletzt genannte Substanz wird heute klinisch für die Behandlung der Gicht angewendet (8, 9, 13, 21, 32, 39,).

Wie oben schon erwähnt, wird von verschiedenen Autoren (16, 17, 18, 22, 23, 24) diskutiert, ob die wichtigste Rolle der XOD im Organismus nicht darin besteht, bei Oxydationsprozessen als Elektronenakzeptor und -donator zu wirken. Obwohl die bedeutende Rolle der XOD im Purinstoffwechsel bei der Bildung von Harnsäure aus ihren Vorstufen nicht bestritten werden soll, so ist doch darauf hinzuweisen, daß bei einem vollständigen oder fast vollständigen Fehlen der XOD, z. B. bei der hereditären Xanthinurie (11, 38), durchaus immer noch Harnsäure im Urin ausgeschieden wird. Auch bei der Therapie der Gicht mit dem XOD-Hemmer Allopurinol geht zwar die Uratausscheidung zurück, sie sistiert jedoch nicht völlig.

Diese Tatsachen veranlaßten GREEN und MAZUR (16, 17) nach einer besonderen Funktion der XOD zu suchen, die die bei ihren experimentellen Untersuchungen gefundenen gleichzeitigen Veränderungen des Eisen- und Purinstoffwechsels verknüpfen könnte (2, 17, 22, 23). Sie stellten daher die einleitend beschriebene Hypothese auf, daß die nach hämorrhagischen und traumatischen Schockzuständen auftretende Zunahme des Serumeisens durch Freisetzung von Eisen aus Leberferritin Teil einer Reaktion sei, bei der Xanthin und Hypoxanthin durch die XOD zu Harnsäure oxydiert werden (s. Abb. 1). Bei der Harnsäurebildung aus Hypoxanthin oder Xanthin in der Leber, soll unter anaeroben Bedingungen (Schock, Hypoxie) die reduzierte XOD mit dem Ferritin reagieren, wobei das Ferri-(III)-Eisen des Ferritins durch Elektronenaufnahme zum Ferro-(II)-Eisen reduziert wird. In der zweiwertigen Form kann das Eisen die Zellmembranen passieren und im Serum an Transferrin gebunden werden, so daß es dann dem Körper z. B. für die Blutbildung zur Verfügung steht.

Weitere experimentelle Untersuchungen schienen diese Hypothese zu stützen:

1. MAZUR et al. konnten zeigen, daß die intravenöse Gabe von Hypoxanthin und Xanthin bei Hunden zur Erhöhung des Serumeisens führt (22). Durch

entsprechende Untersuchungen mit Gefäßkathetern ließ sich dabei feststellen, daß der Eisenanstieg in der Vena hepatica höher ist als in der Arteria femoralis, was für eine Freisetzung des Eisens aus dem Leberferritin spricht. Die Beteiligung der XOD bei diesem Prozess war allerdings damit noch nicht schlüssig bewiesen.

2. Einige in den letzten Jahren erschienene Arbeiten (1, 24), schienen auf Grund klinischer Beobachtungen die Hypothese von der Beteiligung der XOD bei Eisenspeicherungs- und Freisetzungsvorgängen zu stützen. AYVAZIAN (1) beschrieb einen 74-jährigen Mann, bei dem gleichzeitig eine Xanthinurie und eine Hämochromatose bestanden. Die Aktivität der XOD in der sehr fibrotisch veränderten Leber dieses Patienten war stark erniedrigt. Auf Grund der MAZUR'schen Hypothese wurde die Vermutung geäußert, daß die Hämochromatose bei diesem Patienten auf Grund eines genetisch bedingten Enzymdefektes (XOD-Mangel) entstanden sei, so daß Ferrieisen nicht mehr aus der Leber freigesetzt werden könnte. Es wurde die Vorstellung vertreten, daß bei der primären Hämochromatose ein heterozygoter Enzymdefekt vorläge, bei dem nur eine der beiden FAD-Gruppen gehemmt sei, so daß zwar der Elektronentransport für die Eisenreduktion gesperrt sei, der Purinstoffwechsel aber noch normal abliefe. Erst wenn ein homozygoter Defekt, wie bei dem beobachteten Patienten vorläge, käme es auch zur Xanthinurie.

Dagegen läßt sich jedoch anführen, daß bei den bisher beobachteten Stoffwechselstörungen auf Grund eines genetisch bedingten Enzymdefektes die Störung nicht auf ein Organ beschränkt ist, sondern generalisiert im Körper auftritt. Man müßte also bei solch einem (homozygoten?) Patienten auch mit einer verminderten Enzymaktivität im Darm rechnen, wo die XOD normalerweise in relativ hoher Konzentration vorhanden ist. Daher müßte ein XOD-Enzymdefekt auch zu einer Störung der Eisenfreisetzung aus der Darmmukosa und damit zu einer Zunahme der Ferritinkonzentration und zu einer Abnahme der Eisenresorption führen. Das hat sich jedoch nicht bestätigen lassen.

3. Ein starkes Argument gegen die Mitwirkung der XOD im Eisenstoffwechsel war besonders die klinische Beobachtung einer 23-jährigen Patientin mit Xanthinurie, bei der in der Leber und im Jejunum nur eine

geringe, sehr stark erniedrigte Aktivität der XOD nachweisbar war (11, 24). Die Harnsäure im Serum betrug nur o,4 mg%, die Uratausscheidung im Urin lag bei nur 5 mg (normal bis 6oo mg) am Tag. Dagegen war im Serum eine starke Vermehrung der Oxypurine nachweisbar, wovon 7o% Xanthin und 3o% Hypoxanthin waren. Der renale Ausscheidungsmechanismus für Purine war normal. Im Blut und im Darm ließen sich keine Hemmsubstanzen der XOD nachweisen. Die Fermentaktivität war durch Verabreichung von FAD, Molybdän oder Eisen nicht normalisierbar. Diese Patientin hatte keinerlei Störungen des Eisenstoffwechsels, keine Hämosiderose der Leber oder Hämochromatose. Die Eisenresorption war trotz der fehlenden XOD im Darm normal oder leicht erhöht. Auf Grund dieser klinischen Befunde war eine Beteiligung der XOD am Eisenstoffwechsel, insbesondere Speicherungs- und Resorptionsvorgängen unwahrscheinlich. In den letzten Jahren wurdenjedoch erneut Widersprüchliche Befunde zur Bedeutung der XOD für den Eisenstoffwechsel mitgeteilt (24, 25, 27, 35, 36). Daher erschien eine erneute Untersuchung über die Beteiligung der XOD an der Eisenspeicherung mit neuen experimentellen Versuchsanordnungen erforderlich, da diese Frage aus theoretischen, pathophysiologischen und klinischen Gründen von großer Bedeutung ist.

Es war das Ziel der vorliegenden Untersuchungen, auf zwei verschiedenen Wegen zu prüfen, ob der Eisen- und Purinstoffwechsel durch das Enzym XOD bei physiologischen und pathophysiologischen Stoffwechselprozessen miteinander verknüpft sind:

1. Es sollte durch eine mehrwöchige eisenfreie Ernährung der Eisenstoffwechsel verändert und der Einfluß auf die XOD-Aktivität untersucht werden.
2. Umgekehrt sollte festgestellt werden, ob eine Hemmung der XOD durch Allopurinol einen Einfluß auf den Eisenstoffwechsel und die körpereigenen Eisendepots hat.

Die im Experiment I durchgeführte 6-wöchige eisenfreie Ernährung führte zu einer signifikanten Abnahme des Hämoglobins im Blut und der Eisendepots, wie sich durch Bestimmung des Nicht-Hämineisens in der Leber zeigen ließ. Die Tiere entwickelten sich trotzdem normal und wiesen auch keine Verminderung des Gesamtproteingehaltes der Leber auf.

Daher kann die signifikante Abnahme der XOD-Aktivität nicht durch eine Unterernährung erklärt werden. Bei dieser Versuchsanordnung, wobei durch eine eisenarme Ernährung alle Körpereisendepots mobilisiert werden und damit ein starker Eisentransport und Eisenaustausch stattfindet, sinkt also die Aktivität der XOD ab. Daher ist eine direkte Teilnahme der XOD am Eisenstoffwechsel unwahrscheinlich. Möglicherweise kann die Abnahme der XOD-Aktivität damit erklärt werden, daß die Enzymaktivität der eisenenthaltenden XOD durch Eisenmangel beeinträchtigt wird. Für diese Auffassung spricht, daß durch eine einmalige, relativ kleine Dosis von Eisen die Aktivität der XOD vollständig normalisiert werden kann (Experiment II).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch STROHMEYER und Mitarb. (35, 36), die ebenfalls eine Abnahme der XOD unter eisenfreier Ernährung von Ratten feststellten. Nach zweistündigem Sauerstoffmangel kam es zwar bei den Tieren zu einem gleichzeitigen Anstieg des Serumeisens und der Harnsäure im Serum. Diese Veränderungen waren jedoch nicht von der Aktivität der XOD abhängig. Wenn Ratten nach einer längeren eisenreichen Ernährung für mehrere Stunden sauerstoffarme Luft atmeten, kam es gleichzeitig mit starken Veränderungen des Eisenstoffwechsels auch zu einem Anstieg der XOD-Aktivität. Eine ursächliche Beziehung zwischen den Änderungen des Eisenstoffwechsels und der XOD-Aktivität ließ sich jedoch nicht feststellen. Durch eine orale und intraperitoneale Gabe von Xanthin, einem Substrat der XOD, ließ sich zwar die Aktivität der XOD steigern, eine Änderung der Eisenfreisetzung aus Depots oder ein Wechsel in der Eisenresorption trat jedoch nicht ein. Auch während einer gesteigerten Eisenresorption änderte sich die XOD-Aktivität in der Dünndarmmukosa nicht, so daß eine Beteiligung dieses Enzyms bei Eisenresorptionsvorgängen als unwahrscheinlich angesehen wurde (36). Wenn die Aktivität der XOD für die Freisetzung von Eisen aus Ferritineisen in der Leber von Bedeutung wäre, dann müßte es nach längerer Hemmung dieses Enzyms zu einer deutlichen Zunahme der Eisendepots in der Leber kommen. Daher erhielten Ratten im Experiment III und Experiment IV Allopurinol (4-Hydroxy-pyrazolo(3-4-d)-Pyrimidin), eine spezifische Hemmsubstanz der XOD, oral und intraperitoneal. Die Hemmung des Enzyms ist dosisabhängig, wie die Ergebnisse des Ex-

perimentes III zeigen. Erst nach einer Dosis von 45 mg Allopurinol/ kg Körpergewicht oral ließ sich ein Hemmeffekt auf die XOD feststellen. Während die XOD sowohl nach oraler wie nach i.p.-Verabreichung in der Leber abnahm, änderte sich überraschenderweise die Enzymaktivität in der Darmmukosa nur nach oraler Zufuhr von Allopurinol; nach intraperitonealer Applikation blieb die Enzymaktivität normal. Möglicherweise ist die Ursache dafür die schlechte Löslichkeit des Allopurinols, das erst nach starker Alkalisierung mit Natronlauge bei einem pH von 1o,5 in Lösung geht und injizierbar wird.

Die Hemmung der XOD durch Allopurinol führte zu einer signifikanten Zunahme des Nicht-Hämineisens in der Leber und des Ferritineisens in der Darmmukosa. Damit schien die Hypothese von GREEN und MAZUR (16, 17, 18, 22, 23) bestätigt, daß eine Hemmung der XOD zu einer verstärkten Eisenablagerung in den Körperorganen führt. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von POWELL und EMMERSON (1o, 27, 28), die bei allopurinolbehandelten Ratten ebenfalls eine Zunahme der Eisenspeicherung feststellen konnten. Dagegen wurde bisher noch keine Zunahme der Lebereisendepots bei gichtkranken Patienten bekannt, die über Monate aus therapeutischen Gründen Allopurinol zur Hemmung der Purinbiosynthese erhalten hatten (33, 39).

Die Zunahme des Mukosaferritins müßte nach den Vorstellungen von CONRAD und CROSBY (3, 4) zu einer Hemmung der Eisenresorption führen, da bei reichlichen Eisendepots in der Darmschleimhaut die Resorption gehemmt wird. In früheren Untersuchungen von STROHMEYER et al. (35, 36), durch Eisenresorptionsuntersuchungen bei Menschen unter Allopurinol (5), bei tierexperimentellen Untersuchungen von KINNEY et al. (6, 2o) und bei hier nicht näher beschriebenen eigenen tierexperimentellen Untersuchungen konnte gesichert werden, daß die XOD am Mechanismus der Eisenresorption nicht direkt beteiligt ist. Da für die Entwicklung einer Hämochromatose eine über lange Zeit erhöhte Eisenresorption Voraussetzung ist, spielt aus den oben dargelegten Gründen eine Aktivitätsänderung der XOD pathogenetisch wahrscheinlich keine Rolle.

Die zusätzliche Eisenverabreichung mit dem Trinkwasser führte im Vergleich zu den nur mit Allopurinol behandelten Ratten (Experiment IV) zu einer noch stärkeren Erhöhung des Depoteisens in Leber und Darm. Die XOD-Aktivität in der Leber ist in dieser Tiergruppe am niedrigsten. Dagegen ist die XOD-Aktivität in der Darmmukosa ebenfalls unverändert. Der Unterschied in der XOD-Aktivität zwischen allopurinolbehandelten Tieren (Gruppe B_1) und Allopurinol + Eisen-behandelten Ratten (Gruppe C_1) ist nicht signifikant verschieden. Das entspricht auch früheren Befunden anderer Autoren (15, 35, 36), die ebenfalls keinen Einfluß einer erhöhten Eisenzufuhr auf die XOD-Aktivität feststellen konnten.

Da mit Allopurinol eine Hemmung der XOD und gleichzeitig eine vermehrte Eisen-Speicherung der Leber herbeigeführt werden konnte, interessierte natürlich die Beantwortung der Frage, ob es sich dabei um einen spezifischen Effekt des Allopurinols handle. Aus diesem Grunde wurden im Experiment IV außer der Xanthinoxydase noch die Glycerin-Aldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH), ein Schlüsselenzym des Intermediärstoffwechsels in der Leber und in der Darmmukosa mitbestimmt. Dabei ließ sich zeigen, daß auch die Aktivität dieses Enzyms signifikant abfällt! Die Wirkung des Allopurinols auf den Eisenstoffwechsel bzw. Eisenspeicherung scheint also unspezifisch zu sein. Wahrscheinlich sind die zunehmende Eisenspeicherung unter Allopurinol und die XOD-Hemmung zwei gleichzeitig ablaufende, aber ursächlich voneinander unabhängige Stoffwechselprozesse. Zu dieser Auffassung kamen auch DE MONTERICE et al. (6) und STROHMEYER et al. (35, 36) auf Grund ihrer experimentellen Untersuchungen.

Von MAZUR und CARLETON (24) wurde kürzlich berichtet, daß sich bei fötalen und neugeborenen Ratten mit fehlender Leber-XOD ein hoher Ferritingehalt der Leber feststellen läßt. Kurz nach der Geburt steigt über 6 bis 1o Tage die XOD-Aktivität an, während der Ferritingehalt abfällt. Die Autoren schlossen daraus, daß diese Prozesse miteinander ursächlich verknüpft seien. Andere Enzyme als die XOD wurden jedoch nicht bestimmt, so daß auf Grund dieser Untersuchungen nicht gesagt

werden kann, ob die Änderung der Enzymaktivität nicht auch andere Enzyme betrifft. Der ursächliche Zusammenhang zwischen den beschriebenen Stoffwechseländerungen konnte nicht bewiesen werden.

Auch die von MAZUR und SACKLER (25) beschriebene starke Verminderung oder Fehlen der XOD bei Patienten mit Hämochromatose und einigen Patienten mit Lebercirrhose ist kein Beweis für die Hypothese, daß der Enzymmangel ätiologisch oder pathogenetisch für die Hämosiderose von Bedeutung ist. Auch bei einer eiweißarmen Ernährung sinkt die XOD-Aktivität sehr schnell ab, ohne daß dabei in jedem Fall eine Eisenspeicherung eintritt. Die XOD-Aktivität ist stark vom Ernährungszustand und von der Ernährung selber abhängig. Bei eiweißarmer Ernährung kommt es sehr schnell zu einem starken Abfall der XOD-Aktivität. Es ist nicht bekannt, ob mit Normalisierung der XOD-Aktivität bei Patienten mit Eiweißmangelsyndromen und Kwashiorkor durch eiweißreiche Ernährung auch die manchmal feststellbare Siderose der Leber und anderer Organe abnimmt. Die bei Cirrhose und Hämochromatosen feststellbare niedrige XOD-Aktivität (25) könnte also auch durch einen bei diesen Erkrankungen häufigen Eiweiß- bzw. Albuminmangel bedingt sein. Zum Beweis der Hypothese des ursächlichen Zusammenhanges zwischen (angeborenem?) Mangel an XOD und Entwicklung einer Siderose bei Hämochromatosen und Cirrhosen müßten Langzeituntersuchungen bei Patienten im Frühstadium ihrer Krankheit, bei Geschwistern, Zwillingen und Kindern von Patienten mit Eisenspeicherkrankheiten durchgeführt werden. Bisherige eigene Untersuchungen zu dieser Frage wurden dadurch erschwert, daß die bei Leberbiopsien gewonnenen kleinen Leberzylinder zur Bestimmung der XOD-Aktivität nicht ausreichen.

Abschließend wird noch einmal festgestellt, daß es unter verschiedenen experimentellen Bedingungen möglich ist, gleichzeitig mit Änderungen der Enzymaktivität der XOD den Eisengehalt der Leber und der Dünndarmmukosa zu verändern. Es ließ sich aber auf Grund früherer und hier vorgelegter Untersuchungen nicht sichern, daß es sich dabei um ursächlich voneinander abhängige Stoffwechselvorgänge handelt. Die orale Verabreichung von Allopurinol führt zu einer Hemmung der XOD und zur Organsiderose. Die hier vorgelegten experimentellen Daten lassen vermuten,

daß diese Befunde durch einen unspezifischen Effekt des Allopurinols auf den Eisenstoffwechsel hervorgerufen werden. Die Organsiderose ist dabei nicht Folge einer gesteigerten Hämolyse oder einer erhöhten Eisenresorption.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Der Mechanismus der Eisenspeicherung und Freisetzung von Eisen aus Organdepots ist noch weitgehend unbekannt. Es wurde vermutet, daß das Enzym Xanthinoxydase (XOD) eine regulierende Rolle bei Austauschvorgängen zwischen dem Depoteisen in der Leber und dem im Plasma transportierten Eisen spielt. Eine verminderte XOD-Aktivität sollte für eine mangelhafte Mobilisierung des Eisens verantwortlich sein und zu einer verstärkten Siderose der Leber führen. Die XOD wird durch Allopurinol (4-Hydroxypyrazolo-(3-4-d)-Pyrimidin) gehemmt.

Die hier vorgelegten experimentellen Untersuchungen hatten das Ziel, den Einfluß der XOD-Aktivität auf den Eisenstoffwechsel und die Eisendepots festzustellen. Dabei wurden folgende Ergebnisse gewonnen:

1. Bei 6 Wochen eisenarm ernährten wachsenden Ratten (9o-1oo g) kommt es zu einer Abnahme der XOD-Aktivität in der Leber und Darmmukosa, zu einer Reduzierung des Depoteisens in der Leber und zu einer Eisenmangelanämie.

2. Allopurinol hemmt die XOD-Aktivität nur in der Leber, die XOD-Aktivität in der Darmmukosa bleibt normal. Die Eisenresorption wird durch die Änderung der XOD-Aktivität nicht beeinflußt. Unter Allopurinol kommt es zu einer deutlichen Siderose der Leber. Die Ursache dafür ist unklar.

3. Außer der Xanthinoxydase (XOD) sinkt auch die Aktivität der Glycerin-Aldehyd-3-Phosphatdehydrogenase in der Leber unter Allopurinol ebenfalls signifikant ab, während die Nicht-Hämineisenkonzentration zunimmt. Wahrscheinlich hat Allopurinol nur einen unspezifischen Effekt auf den Eisenstoffwechsel der Leber.

LITERATUR

1 AYVAZIAN, J.H.:
Xanthinuria and hemochromatosis
New Eng. J. Med. 27o (1964), 18

2 CHENEY, B. and C.A. FINCH:
Effect of inosine on iron absorption in rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 1o3 (196o), 37

3 CONRAD, M.E. and W.H. CROSBY
Intestinal mucosal mechanism controlling iron absorption.
Blood 22 (1963) 4o6

4 CROSBY, W.H.:
The control of iron bälance by the intestinal mucosa
Blood 22 (1963) 441

5 DAVIS, P.S. and D.J. DELLER:
Effect of xanthine oxidase inhibitor (Allopurinol) on radioiron in man.
Lancet II (1966), 47o

6 DE MONTERICE, B., N. KAUFMAN, T. KINNEY and J. V. KLAVINS, N. C. DURHAM:
Liver iron and xanthine oxidase levels
Arch. Path. 72 (1961), 55o

7 ELION, G.B., T. J. TAYLOR and G.H. HITCHINGS:
Binding of substrates and inhibitor to xanthine oxidase from different species.
Abstracts, Sixth Internat. Cong. of Bio. Sect. VV, Ny. July 26. Aug. 1 (1964), 3o5

8 ELION, G.B.:
Enzymatic and metabolic studies with Allopurinol
Ann. Rheumat. Dis. 25 (1966), 6o8

9 ELION, G.B., T. F. Yü, A.B. GUTMAN and G.H. HITCHINGS:
Renal clearance of oxipurinol, the chief metabolite of Allopurinol
Amer. J. Med. 45 (1968), 69

1o EMMERSON, B.T.:
Effects of Allopurinol on iron metabolism in man.
Ann. rheum. Dis. 25 (1966), 7oo

11 ENGELMAN, K., R.W.E. WATTS, J.R. KLINENBERG, A. SJOERDSMA and J.E. SEEGMILLER:
Clinical, Physiological and Biochemical Studies of a Patient with Xanthinuria and Pheochromocytoma
Amer. J. Med. 37 (1964), 839

12 FRIDOVICH, I. and P. HANDLER:
Xanthine oxidase II. Studies of active sites.
J. Biol. Chem. 231 (1958), 899

13 GAMP, A., B. KNICK und A. SCHILLING:
Behandlung der chronischen Gicht durch Hemmung der Harnsäurebildung mit Allopurinol.
Med. Klin. 61 (1966), 1791

14 GILBERT, D.A.:
The Chemistry of Xanthine Oxidase
(The inhibition of the Bovine enzyme by purine 6-Aldehyde)
Biochem. J. 93 (1964), 214

15 GOLDBERG, L., L. E. MARTIN and A. BATCHELOR:
Biochemical changes in the tissues of animals injected with iron: Acid phosphatase and other enzymes.
Biochem. J. 77 (196o), 252

16 GREEN, S. and A. MAZUR:
Reduction of Ferritin-Iron by Xanthine oxidase.
Federat. Proceedings 16 (1957), 188

17 GREEN, S., A.K. SAHA, A.W. CARLETON and A. MAZUR:
Release of storage iron to the plasma by xanthine oxidase after purine administration.
Federat. Proceed. 17 (1958), 233

18 GREEN, S., and A. MAZUR:
Relation of uric acid metabolism to release of iron from hepatieferritin.
J. Biol. Chem. 227 (1957), 653

19 KALCKAR, H.M.:
Differential Sprectrophotometry of Purine compounds by mean of specific enzymes III. Studies of the enzymes of purine metabolism.
J. Biol. Chem. 167 (1947), 461

2o KINNEY, T.D., N. KAUFMAN and J.V. KAVLINS:
Xanthine oxidase activity and iron storage in the rat liver.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 1o8 (1961), 22

21 KLINENBERG, J.R., S.E. GOLDFINGER and J.E. SEEGMILLER:
The effectivnes of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in the treatment of gout.
Ann. Int. Med. 62 (1965), 639

22 MAZUR, A., S. GREEN, A. SAHA and A. CARLETON
Mechanism of release of ferritin iron in vivo by xanthine oxidase.
J. Clin. Invest. 37 (1958), 18o9

23 MAZUR, A., S. GREEN and A. CARLETON:
Mechanism of Plasma Iron Incorporation into Hepatic Ferritin
J. biol. Chem. 235 (196o), 595

24 MAZUR, A., A. CARLETON:
Hepatic Xanthine oxidase and ferritin iron in the developing rat.
Blood 26 (1965), 317

25 MAZUR, A., and M. SACKLER:
Haemochromatosis and hepatic xanthine oxidase.
Lancet I (1967), 254

26 MORELL, D.B.:
The nature and catalytic activities of milk xanthine oxidase.
Biochem. J. 51 (1952), 651

27 POWELL, L. W. and B.T. EMMERSON:
Hemosiderosis association with xanthine oxidase inhibition
Lancet I (1966), 239

28 POWELL, L.W.:
Effects of Allopurinol on iron storage in the rats.
Ann. rheum. Dis. 25 (1966), 697

29 RAMSAY, W.N.M:
The Determination of Iron in Blood serum or Plasma.
Clin. Chem. Acta. 2 (1957), 214

3o RAMSAY, W.N.M.:
The Determination of the Total Iron-Binding Capacity of Serum.
Clin. Chem. Acta 2 (1957), 221

31 RICHERT, D.J. and W.W. WESTERFELD:
The Relationship of Iron to Xanthine oxidase.
J. biol. Chem. 2o9 (1954), 179

32 RUNDLES, R.W., G.B. ELION and G.H. HITCHINGS:
Allopurinol in the treatment of gout and secondary hyperurieemia.
Bull. Rheumat. Dis. 16 (1966), 4oo

33 RUNDLES, R.W.:
Metabolic effects of allopurinol and alloxanthine.
Ann. rheum. Dis. 25 (1966), 615

34 SEEGMILLER, J.E., K. ENGELMAN, J.R. KLINENBERG, R.W.E. WATTS, A. SJOERDSMA:
Xanthine oxidase and iron.
New Eng. J. Med. 27o (1964), 534

35 STROHMEYER, G.W., M.S. GREENBERG, E.W. MOORE and T.C. CHALMERS:
Relation of xanthine oxidase to iron metabolism in rat.
Clin. Res. 9 (1961), 167

36 STROHMEYER, G.W., S.A. MILLER, R.M. SCARTATA, E.W. MOORE, M.S. GREENBERG and T.C. CHALMER:
Effects of hypoxia on iron absorption and mobilization in the rat.
Amer. J. Physiol. 2o7 (1964), 55

37 WEINFELD, A.:
Storage Iron in Man.
Acta Med. Scand. Suppl. 427 (1965)

38 WYNGAARDEN, J.B.:
Xanthinuria
Metabolic Basis of Inherited Dis. Edited by J.B. Stanburu, J.B. Wyngaarden and D.S. Fredrickson 1477 p.p. N.Y. Mc Graw-Hill (196o), 761

39 ZÖLLNER, N. und M. SCHATTENKIRCHNER:
Allopurinol in der Behandlung der Gicht und der Harnsäure Nephrolithiasis.
Deutsche Med. W. 92 (1967), 654

Herrn Prof. Dr. med. G. A. Martini danke ich für die Möglichkeit, in der Medizinischen Universitätsklinik Marburg als Gastärztin zu arbeiten. Außerdem danke ich ihm und Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Strohmeyer für die Oberlassung des Themas und für alle Hilfe, die sie mir bei der vorliegenden Arbeit zuteil werden ließen. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. H. Goebell und Frau E. Heinemann, die mir fachlich und persönlich unermüdlich zur Seite gestanden haben. Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst in Bad Godesberg bin ich wegen der Gewährung eines großzügigen Stipendiums zu großem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 1o. Juli 1939 wurde ich als Tochter des Staatsbeamten Padung und seiner Ehefrau Taung in Bangkok/Thailand, geboren. Nach der Grundschulzeit besuchte ich für 6 Jahre die Mittelschule und anschließend die Vorbereitungsschule der Chulalongkorn-Universität in Bangkok. Dort bestand ich 1957 das Abitur. Von 1957 bis 1959 studierte ich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Chulalongkorn-Universität in Bangkok und nahm dort am vormedizinischen Unterricht teil. Unmittelbar danach begann ich mein 4-jähriges Medizinstudium an der Medizinischen Siriraj-Universität in Bangkok-Thonburi. 1963 legte ich erfolgreich das Medizinische Staatsexamen ab und erhielt den medizinischen Grad M.D. Nach einjähriger Tätigkeit als Medizinalassistentin ("Intern") in allen Abteilungen des Siriraj-Universitäts-Krankenhauses wurde ich Assistentin ("Resident") in der Inneren Klinik desselben Krankenhauses. Ab Oktober 1965 arbeitete ich als "Instructor" in der gastroenterologischen Abteilung der Inneren Klinik.

Seit dem 1. Dezember 1966 bin ich als Stipendiatin des Deutschen Akademischen Austauschdienstes in Deutschland. Seit April 1967 bin ich nach Besuch des Goethe-Institutes in Murnau/Oberbayern als Gastärztin an der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg tätig. Während dieser Zeit habe ich klinisch auf verschiedenen Stationen der Medizinischen Klinik gearbeitet und außerdem die hier vorgelegten experimentellen Untersuchungen durchgeführt. Ich werde am 1. März 1969 nach Thailand an die Medizinische Universitätsklinik in Bangkok zurückkehren.

Meine akademischen Lehrer an der Siriraj Hospital Universität in Bangkok Thailand waren die Herren Professoren und Dozenten :

Bhatdrakom, Benyakarn, Boonnak, Buri, Chatikavanich, Chaiyaporn, Harinasuta, Juengjaroen, Julapan, Kangsdal, Ketusinh, Kuchaseni, Kunvisal, Metiyawong, Na-Bangchang, Na-Nakorn, Netrasiri, Niyomsen, Ossathanondh, Pacharee, Parichanondh, Plengvanit, Poshakrishna, Pukavesa, Sangvichien, Satsanjuan, Skulthai, Smerasuta, Sripen, Sukanthaketu, Sukonthapan, Sukavajana, Suwannik, Tansurat, Tantanan, Tapwongs, Thienprasit, Tuchinda, Trisnanon, Utayanang, Varavej, Viranuvatti, Vuthipoom.